

10/511221

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Oktober 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/087356 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/00**

SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03519

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. April 2003 (04.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 16 738.9 16. April 2002 (16.04.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BAYER CROPSCIENCE AG** [DE/DE]; Alfred-No-
bel-Str. 50, 40789 Monheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ANTONICEK, Horst-
Peter** [DE/DE]; Brahmsstr. 2 A, 51467 Bergisch Gladbach
(DE). **SCHNIZLER, Katrin** [DE/DE]; Odenwaldstr. 21,
63517 Rodenbach (DE). **WEIDLER, Marcus** [DE/DE];
Lützenkirchener Str. 240, 51381 Leverkusen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER CROPSCIENCE AG**;
Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität
einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17
Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **HELICOKININ-RECEPTOR FROM INSECTS**

(54) Bezeichnung: **HELICOKININ-REZEPTOR AUS INSEKTEN**

(57) Abstract: The invention relates to polypeptides which perform the biological activity of a helicokinin-receptor, in addition to polynucleotides which code for said polypeptides and especially the use thereof for detecting active ingredients for the protection of plants.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Polypeptide, welche die biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausüben, sowie Polynukleotide, die für diese Polypeptide codieren und insbesondere deren Verwendung zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/087356 A2

Helicokinin-Rezeptor aus Insekten

Die Erfindung betrifft Polypeptide, welche die biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausüben, sowie Polynukleotide, die für diese Polypeptide codieren und insbesondere deren Verwendung zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz.

Die Entwicklung von Pestiziden hat sich traditionell vor allem auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der bekannten, pestizid wirksamen chemischen Verbindungen konzentriert. Als Konsequenz daraus wurde der Schwerpunkt der weiteren Bearbeitung besonders bei der Modifizierung von bereits existierenden chemischen Verbindungen und nicht auf die Auffindung und Entwicklung ganz neuartiger Pestizide mit neuen Wirkmechanismen gelegt. Es ist daher von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer Pestizide, neue biologische Angriffspunkte (Target-Proteine) aus z.B. Schadinsekten zu finden, an denen die potentiellen Pestizide binden und ihre Wirkung entfalten können. Diese neuen Target-Proteine können dann auf verschiedene Weise exprimiert und die biologische Funktion in verschiedenen biochemischen Testverfahren geprüft werden. Des Weiteren können mit Hilfe hochdurchsatzfähiger Testverfahren, dem sogenannten Hochdurchsatz-Screening, eine große Vielfalt von chemischen Substanzen relativ kostengünstig und schnell auf ihre Wirkung an dem neuen Target-Protein überprüft werden. Da von Beginn einer solchen Vorgehensweise an klar ist, an welches Target-Protein eine gegebene chemische Substanz bindet, ist es besonders gut möglich, in einem solchen Target-orientierten Ansatz bei der Entwicklung eines neuen Pestizids auf Selektivität in der Wirkungsweise und damit auf Sicherheit zu achten. Eine in einem Hochdurchsatz-Screening oder auf andere Art aufgefundene chemische Verbindung, die z. B. an einem Target-Protein aus Schadinsekten modulierend wirkt, kann direkt an einem homologen Target-Protein, welches aus einer oder mehreren Säugetier-Spezies kloniert wurde, auf Selektivität geprüft werden, um breit wirksame toxische Verbindungen auszuschließen. Besonders gut als Target-Proteine sind solche

Proteine aus z.B. Schadinsekten anzusehen, die nicht in höheren Organismen, wie Säugetieren, vorkommen.

Besonders gut als Target-Proteine und damit als Angriffspunkte für die Entwicklung neuartige Insektizide sind Rezeptoren für biologisch aktive Peptide in Insekten anzusehen. Peptide regulieren die meisten wichtigen Schlüsselfunktionen in Insekten, wie zum Beispiel die Embryonal- und Post-Embryonal Entwicklung, die Ionen-Homeostase, Osmoregulation oder Muskelaktivität (siehe Gäde et al., 1997a; Osborne, 1996). Die biologische Wirkung dieser Peptide wird dabei durch die Bindung an spezifische Rezeptor-Proteine in Insektenzellen vermittelt. Viele dieser endokrinen oder neuronalen Peptide interagieren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; King und Wilson, 1999), die nach der Bindung eines korrespondierenden Peptid-Liganden heterotrimere G-Proteine aktivieren (Vanden Broeck et al., 1997). Antagonisten, die an Peptid-Rezeptoren binden können und die von den natürlichen Peptiden abgeleitet sein oder auch eine völlig neuartige chemische Struktur besitzen können, können beispielsweise mit der normalen Insekten-Entwicklung, dem Wachstum, dem Verhalten oder der Homeostase interferieren und auf diese Weise Insekten-spezifische und Rezeptor-spezifische neuartige Insektizide generieren.

Seit der Isolierung des Neuropeptids Proctolin aus Insekten-Muskelpräparationen (Brown und Starratt, 1975) ist eine Vielzahl von Peptiden aus verschiedenen Insekten-Spezies isoliert und charakterisiert worden (zur Übersicht siehe Vanden Broeck et al., 1997; Osborne, 1996). Substantieller Fortschritt wurde vor allem bei der Aufklärung der Aminosäuresequenz solcher Peptide und bei der Aufklärung der biologischen Funktion in den entsprechenden Insekten-Spezies gemacht. So konnten beispielsweise Peptide, die die Juvenilhormon-Biosynthese beeinflussen können (Allatotropine und Allatostatine, Tobe et al., 1994), Insulin-artige Peptide (Lagueux et al., 1990), Peptide, die den Wasserhaushalt regulieren (Coast, 1998), oder solche Peptide, die die Muskelaktivität steuern können (Holman, 1986; zur Übersicht siehe Gäde, 1997b) aus verschiedenen Spezies isoliert werden.

Peptide aus der Gruppe der Kinine sind aus einer Reihe von Insekten-Spezies aus verschiedenen Familien, u.a. aus Dictyoptera, Orthoptera und Lepidoptera, isoliert worden (Coast, 1998; Blackburn et al., 1995). Sie haben als Gemeinsamkeit eine hochkonservierte Struktur mit einem carboxyterminalen Pentapeptid der Sequenz Phenylalanin-Xaa-Xbb-Tryptophan-Glycin-Amid, wobei Xaa entweder Tyrosin, Histidin, Serin oder Asparagin sein kann, und wobei Xbb entweder Alanin, meist aber Serin oder Prolin sein kann (Coast, 1998). Verwandte Peptide wurden auch aus anderen Invertebraten, wie Mollusken oder Krebsen, isoliert (Cox et al., 1997; Torfs et al., 1999). Die ersten Mitglieder dieser Peptid-Familie wurden auf der Basis ihrer Fähigkeit isoliert, Kontraktionen beim isolierten Darm in Schaben auszulösen (Holman, 1991). Kinine sind in Insekten besonders potente, diuretisch wirkende Peptide, die die Sekretion von primärem Urin in den Malpighischen Organen stimulieren (Coast, 1998).

Die biologischen Funktionen der Peptide können in verschiedenen Testen überprüft werden, welche beispielsweise die Muskelaktivität (Holman, 1991) oder die Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten (Ramsey, 1954) messen. Von einigen dieser biologisch aktiven Peptide ist beschrieben, dass in vivo eine experimentell induzierte übersteigerte Wirkung zum Absterben der Schadinsekten führen kann (Seinsche et al., 2000).

Während eine Vielzahl von Peptiden isoliert, in der Struktur aufgeklärt und die Aminosäuresequenz beschrieben werden konnte, sind demgegenüber in Insekten nur wenige Rezeptoren bekannt, die endokrine oder neuronale Peptide binden können. Beschrieben sind u.a. Rezeptoren für das Diuretische Hormon aus *Manduca sexta* (Reagan, 1994) oder *Bombyx mori* (Ha et al., 2000), für Tachykinin aus *Drosophila* (Li et al., 1991; Monnier et al., 1992), oder für Galanin aus *Drosophila* (Birgul et al., 1999).

Rezeptoren von Kinin-Peptiden sind in Mollusken aus der Teichschnecke *Lymnea stagnalis* (Cox et al., 1997) und in Acari aus einer Zeckenart (*Boophilus microplus*, Holmes et al., 2000) beschrieben. Aus Insekten ist nur in *Drosophila melanogaster* ein Rezeptor für ein *Drosophila*-Kinin beschrieben (Terhzaz et al., 1999). Die zelluläre Antwort auf eine Kinin-Stimulation in Insekten ist ein Anstieg in der intrazellulären Calcium-Konzentration, die letztlich zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen in das Lumen der Malpighischen Gefäße führt (Coast, 1998). In Larven des Schadinsektes *Heliothis virescens* führt die Wirkung der Kinine zu einer erhöhten Flüssigkeits-Sekretion an isolierten Malpighischen Gefäßen und zum anderen nach Injektion in die Hämolymphe der Larven zur Reduktion der Gewichtszunahme und zu partieller Mortalität (Seinsche et al., 2000). Es ist daher von besonderem Interesse, die Rezeptoren für die Kinine aus wirtschaftlich bedeutsamen Schadinsekten bereitzustellen.

Seitdem das Genom von *Drosophila* in Teilen oder komplett als in Datenbanken recherchierbare Sequenz zur Verfügung steht, sind verschiedene Rezeptoren aus dieser Spezies beschrieben oder vorhergesagt worden (Hauser et al., 1998; Lenz et al., 2000a; Lenz et al., 2000b; Eriksen et al., 2000; Vanden Broeck, 2001; Hewes und Tahert, 2001; WO 00/70980; WO 00/31005). *Drosophila melanogaster* aus der Familie der Dipteren ist ein wichtiger Modellorganismus für die Insekten-Genetik, spielt in der Landwirtschaft als Schadinsekt aber keine große Rolle. Die Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen zwischen z.B. homologen Genen aus *Drosophila melanogaster* und anderen Insekten aus anderen Familien oder anderen Invertebraten ist mitunter beträchtlich und überschreitet oft 50% (Hewes und Taghert, 2001). Die Unterschiede auf der Ebene der Nukleotide ist dabei noch größer. Es gelingt daher oft nicht, mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden (z.B. mittels PCR mit DNA-Primern oder mit DNA-Sonden, die von z.B. *Drosophila*-Genen abgeleitet sind) die interessierenden homologen Rezeptor-Gene in einem Invertebraten-Organismus (z.B. einer Lepidopteren-Spezies) aufzufinden und zu isolieren (Pietrantonio et al., 2000).

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, weitere Rezeptoren, an die endokrine oder neuronale Peptide aus Insekten, insbesondere aus wirtschaftlich bedeutsamen Schadinsekten, binden können und über deren Bindung die biologische Funktionen dieser Peptide vermittelt werden kann, und darauf aufbauende Testsysteme mit einem hohen Durchsatz an Testverbindungen (High Throughput Screening Assays; HTS-Assays) bereitzustellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Polypeptiden, welche zumindest eine biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise zumindest 80 %ige Identität, besonders bevorzugt zumindest 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt zumindest 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen (Devereux et al., 1984).

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit

Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht vollständige Rezeptoren darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität eines vollständigen Helicokinin-Rezeptors aufweisen. Polypeptide, die im Vergleich zu dem Helicokinin-Rezeptor, der aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besteht, eine um 50 % höhere oder verminderte Aktivität ausüben, werden noch als erfindungsgemäß betrachtet.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region natürlich vorkommender Rezeptoren Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Helicokinin-Rezeptoren ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;

3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Der Ausdruck "biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors", wie er hierin verwendet wird, bedeutet die Bindung von Helicokinin an einen Peptid-Rezeptor.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Polypeptide stellen Helicokinin-Rezeptoren von Lepidopteren, insbesondere von *Heliothis virescens* dar.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide stellt der Helicokinin-Rezeptor von *Heliothis virescens* dar, welcher die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besitzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Polynukleotide, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide codieren.

Bei den erfindungsgemäßen Polynukleotiden handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide stellt eine cDNA dar, welche eine Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzt.

Polynukleotide, welche unter stringenten Bedingungen an die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 hybridisieren, sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst.

Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Insekten als *Heliothis virescens* isoliert werden, welche für Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Helicokinin-Rezeptoren codieren.

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: 6X SSC / 0 % Formamid, bevorzugte Hybridisierungslösung: 6X SSC / 25 % Formamid

Hybridisierungstemperatur: 34°C, bevorzugte Hybridisierungstemperatur: 42°C

1. Waschschrift: 2X SSC bei 40°C,
2. Waschschrift: 2X SSC bei 45°C; bevorzugter 2. Waschschrift: 0,6X SSC bei 55°C; besonders bevorzugter 2. Waschschrift: 0,3X SSC bei 65°C.

Weiterhin sind von der vorliegenden Erfindung Polynukleotide umfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise zumindest 80 %ige Identität, besonders bevorzugt zumindest 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt zumindest 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Nukleotiden und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

Der Grad der Identität der Polynukleotidsequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und einen heterologen Promotor umfassen.

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert. Der Ausdruck "Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich allgemein auf Expressionskontrollsequenzen.

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele

für heterologe Promotoren sind der frühe oder späte Promotor des SV40, des Adenovirus oder des Cytomegalovirus, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor des für 3-Phosphoglyceratkinase codierenden Gens, der Promotor des für Saure Phosphatase codierenden Gens und der Promotor des für den α -Mating-Faktor der Hefe codierenden Gens.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid bzw. ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Polynukleotide nicht enthalten.

Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, wie Bakterien der Gattungen Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Streptococcus, Staphylococcus, vorzugsweise E. coli, als auch eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-, Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, Kc-, CHO-, COS1-, COS7-, HeLa-, C127-, 3T3- oder BHK-Zellen und insbesondere Xenopus-Oocyten.

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen

Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin lässt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen. Daher erstreckt sich der Ausdruck "Antikörper", wie er hierin verwendet wird, auch auf Teile vollständiger Antikörper, wie Fa-, F(ab')₂- oder Fy-Fragmente, welche noch die Fähigkeit besitzen, an die Epitope der erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden.

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können insbesondere zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsysteme eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide basieren. Ferner kann man auf der Grundlage der hierin offenbarten Informationen transgene Invertebraten herstellen, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Promotoren eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide eintritt.

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise bei *Drosophila melanogaster* durch P-Element vermittelten Gentransfer (Hay et al., 1997) oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon-vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1; Plasterk, 1996).

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest ein erfindungsgemäßes Polynukleotid enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Polypeptide in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Polynukleotiden codiert werden, können Wirtszellen, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Dabei kann das zu exprimierende Polynukleotid an die "Codon Usage" der Wirtszellen angepasst werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in in vitro-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Polynukleotids synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Da die erfindungsgemäßen Helicokinin-Rezeptoren Membranproteine darstellen, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergensextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und

Tertiärstrukturen der Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

Die Reinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann die Isolierung von Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die erfindungsgemäßen Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in vergleichbaren Membranen von Zellen gefunden wird, die Helicokinin-Rezeptoren natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts an erfindungsgemäßen Polypeptiden gegenüber einem Rohextrakt aus Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert. Die Reinheit bzw. der Proteingehalt der Präparationen kann auf an sich bekannte Weise, beispielsweise durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

Ferner sind auch Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polynukleotide Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Polynukleotide vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Polynukleotide chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten

Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken oder ausgehend von genomischer Insekten-DNA hergestellte genomische Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Polynukleotide.

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Polynukleotide bzw. Polypeptide können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und Tier, wie chemische Verbindungen, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Helicokinin-Rezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfasst, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfasst, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Eine Veränderung der Rezeptoreigenschaften kann beispielsweise wie nachstehend in Beispiel 2 beschrieben detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, beispielsweise insektizide Substanzen aufzufinden.

Rezeptoren verändern vorzugsweise nach Aktivierung die Konzentration von intrazellulärem cAMP oder intrazellulärem Calcium über eine Interaktion mit G-Proteinen. Veränderungen der Rezeptoreigenschaften durch chemische Verbindungen können

deshalb nach heterologer Expression zum Beispiel durch Messung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen direkt über ELISA-Assaysysteme (Biomol, Hamburg, Deutschland) oder RIA-Assaysysteme (NEN, Schwalbach, Deutschland) im HTS-Format gemessen werden. Eine indirekte Messung der cAMP-Konzentration ist mit Hilfe von Reportergenen (z.B. Luziferase) möglich, deren Expression von der cAMP-Konzentration abhängig ist (Stratowa et al., 1995). Die Koexpression von Rezeptoren mit besonderen G-Proteinen, z.B. $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ oder auch chimären G-Proteinen, in heterologen Systemen und die Messung des Anstiegs von Calcium, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Äquorin, ist eine alternative Screeningmöglichkeit (Stables et al., 1997; Conklin et al., 1993).

Weiterhin kann die Bindung von GTP an das aktivierte G-Protein als read-out-System für die Prüfung von Substanzen herangezogen werden.

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide bzw. Polypeptide ermöglichen auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden, ohne dass eine Aktivitätsänderung der Rezeptoren gemessen werden muss. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten und die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben. In solchen Bindungsexperimenten können die erfindungsgemäßen Polypeptide in markierter Form eingesetzt werden.

Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die erfindungsgemäßen Rezeptoren aktiviert.

Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das einen Agonisten von seiner Bindungsstelle verdrängt.

Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können Mimetika von natürlichen Substraten und Liganden darstellen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

Die Bindung der Modulatoren an die erfindungsgemäßen Polypeptide kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben, zur Paralyse oder zur Sterilität der damit behandelten Insekten führt. In vivo-Tests an Insekten, Insektenlarven oder Insekteneiern zum Verifizieren der insektiziden Eigenschaften der aufgefundenen Modulatoren sind hinlänglich bekannt.

Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide als Insektizide oder Arzneimittel - im Folgenden "Wirkstoffe" genannt.

Die Wirkstoffe können in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Lösungen, Emulsionen, Spritzpulver, Suspensionen, Pulver, Stäubemittel, Pasten, lösliche Pulver, Granulate, Suspensions-Emulsions-Konzentrate, Wirkstoff-imprägnierte Natur- und synthetische Stoffe sowie Feinstverkapselungen in polymeren Stoffen.

Diese Formulierungen werden in bekannter Weise hergestellt, z.B. durch Vermischen der Wirkstoffe mit Streckmitteln, also flüssigen Lösungsmitteln und/oder festen Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln, also Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln und/oder schaum erzeugenden Mitteln.

Im Falle der Benutzung von Wasser als Streckmittel können z.B. auch organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden. Als flüssige Lösungsmittel kommen im wesentlichen in Frage: Aromaten, wie Xylol, Toluol, oder Alkyl-naphthaline, chlorierte Aromaten und chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Chlorbenzole, Chlorethylene oder Methylenchlorid, aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Cyclohexan oder Paraffine, z.B. Erdölfraktionen, mineralische und pflanzliche Öle, Alkohole, wie Butanol oder Glykol sowie deren Ether und Ester, Ketone wie Aceton, Methylethylketon, Methylisobutylketon oder Cyclohexanon, stark polare Lösungsmittel, wie Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, sowie Wasser.

Als feste Trägerstoffe kommen in Frage:

z.B. Ammoniumsalze und natürliche Gesteinsmehle, wie Kaoline, Tonerden, Talkum, Kreide, Quarz, Attapulgit, Montmorillonit oder Diatomeenerde und synthetische Gesteinsmehle, wie hochdisperse Kieselsäure, Aluminiumoxid und Silikate, als feste Trägerstoffe für Granulate kommen in Frage: z.B. gebrochene und fraktionierte natürliche Gesteine, wie Calcit, Marmor, Bims, Sepiolith, Dolomit sowie synthetische Granulate aus anorganischen und organischen Mehlen sowie Granulate aus organischem Material, wie Sägemehl, Kokosnussschalen, Maiskolben und Tabakstängeln; als Emulgier- und/oder schaumzeugende Mittel kommen in Frage: z.B. nichtionogene und anionische Emulgatoren, wie Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, z.B. Alkylaryl-polyglykolether, Alkylsulfonate, Alkylsulfate, Arylsulfonate sowie Einweißhydrolysate; als Dispergiermittel kommen infrage: z.B. Lignin-Sulfitablaugen und Methylcellulose.

Es können in den Formulierungen Haftmittel, wie Carboxymethylcellulose, natürliche und synthetische pulvrige, körnige oder latexförmige Polymere verwendet werden, wie Gummiarabicum, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, sowie natürliche Phospholipide, wie Kephaline und Lecithine und synthetische Phospholipide. Weitere Additive können mineralische und vegetabile Öle sein.

Es können Farbstoffe, wie anorganische Pigmente, z.B. Eisenoxid, Titanoxid, Ferrocyanblau und organische Farbstoffe, wie Alizarin-, Azo- und Metallphthalocyanin-farbstoffe und Spurennährstoffe, wie Salze von Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Kobalt, Molybdän und Zink verwendet werden.

Die Formulierungen enthalten im allgemeinen zwischen 0,1 und 95 Gew.-% Wirkstoff, vorzugsweise zwischen 0,5 und 90 %.

Die Wirkstoffe können vorzugsweise als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden, insbesondere zur Bekämpfung von Insekten aus der Ordnung der Lepidoptera, wie z.B. *Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*, *Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella xylostella*, *Malacosoma neustria*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp., *Bucculatrix thurberiella*, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Earias insulana*, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flammea*, *Spodoptera* spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta nubilalis*, *Ephestia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea pellionella*, *Hofmannophila pseudospretella*, *Cacoecia podana*, *Capua reticulana*, *Choristoneura fumiferana*, *Clysia ambiguella*, *Homona magnanima*, *Tortrix viridana*, *Cnaphalocerus* spp., *Oulema oryzae*.

Die Behandlung der Pflanzen und Pflanzenteile mit den Wirkstoffen erfolgt direkt oder durch Einwirkung auf deren Umgebung, Lebensraum oder Lagerraum nach den üblichen Behandlungsmethoden, z.B. durch Tauchen, Sprühen, Verdampfen, Vernebeln, Streuen, Aufstreichen und bei Vermehrungsmaterial, insbesondere bei Samen, weiterhin durch ein- oder mehrschichtiges Umhüllen.

Die Wirkstoffe eignen sich auch zur Bekämpfung von Insekten, die landwirtschaftliche Nutztiere, wie z.B. Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Schweine, Esel, Kamele, Büffel, Kaninchen, Hühner, Puten, Enten, Gänse, Bienen, sonstige Haustiere, wie z.B. Hunde, Katzen, Stubenvögel, Aquarienfische sowie sogenannte Versuchstiere, wie z.B. Hamster, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse befallen.

Durch die Bekämpfung dieser Insekten sollen Todesfälle und Leistungsminderungen (bei Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern, Honig usw.) vermindert werden, so dass durch den Einsatz der Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.

Die Anwendung der Wirkstoffe geschieht im Veterinärsektor in bekannter Weise durch enterale Verabreichung in Form von beispielsweise Tabletten, Kapseln, Tränken, Drenchen, Granulaten, Pasten, Boli, des feed-through-Verfahrens, von Zäpfchen, durch parenterale Verabreichung, wie zum Beispiel durch Injektionen (intramuskulär, subcutan, intravenös, intraperitoneal u.a.), Implantate, durch nasale Applikation, durch dermale Anwendung in Form beispielsweise des Tauchens oder Badens (Dippen), Sprühens (Spray), Aufgießens (Pour-on und Spot-on), des Waschens, des Einpuderns sowie mit Hilfe von wirkstoffhaltigen Formkörpern, wie Halsbändern, Ohrmarken, Schwanzmarken, Gliedmaßenbändern, Halftern, Markierungsvorrichtungen usw.

Bei der Anwendung für Vieh, Geflügel, Haustiere etc. kann man die Wirkstoffe als Formulierungen (beispielsweise Pulver, Emulsionen, fließfähige Mittel), die die Wirkstoffe in einer Menge von 1 bis 80 Gew.-% enthalten, direkt oder nach 100 bis 10 000-facher Verdünnung anwenden oder sie als chemisches Bad verwenden.

Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten, ist es auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern.

Die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide, Vektoren und regulatorischen Regionen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide codieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Rezeptoren in Insekten beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin

beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zur Abbildung1:

SEQ ID NO: 1 zeigt die Polynukleotidsequenz der isolierten Helicokinin-Rezeptor-cDNA. SEQ ID NO: 2 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids, das von der Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 codiert wird.

Die Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der elektrophysiologischen Messung nach Injektion von Helicokinin-Rezeptor-DNA in *Xenopus*-Oocyten und der Zugabe von Helicokinin-Peptid (Helicokinin III, 100nM, Blackburn et al., 1995) im Vergleich zur Applikation von Peptid an Kontroll-Oocyten, in denen vorher keine Helicokinin-Rezeptor-DNA injiziert wurde.

Beispiele:**Beispiel 1**

Isolierung der beschriebenen Polynukleotidsequenzen

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA-Technologie (Sambrook et al., 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programmpaket GCG Version 9.1 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

Beispiel 2**Generierung der Expressionskonstrukte**

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich der SEQ ID NO: 1 amplifiziert und in den Vektor pCMV Script EX (Stratagene, La Jolla, USA) einkloniert.

Heterologe Expression

Die funktionelle Expression des Helicokinin-Rezeptors aus *Heliothis virescens* erfolgt in *Xenopus*-Oocyten. Dazu werden teilweise auch G-Protein aktivierbare Kalium-Kanäle (GIRK1 und GIRK4) koexprimiert, um die Aktivierung der Rezeptoren zu messen (White et al., 1998).

Oocyten-Messungen**1. Präparation der Oocyten**

Die Oocyten stammen von einem adulten weiblichen *Xenopus laevis*-Frosch (Firma Horst Kähler, Hamburg, Deutschland). Die Frösche werden in großen Tanks mit zirkulierendem Wasser bei einer Wassertemperatur von 18-20°C gehalten. Teile des

Frosch-Ovars werden unter vollständiger Anaesthesie durch einen kleinen Schnitt im Abdomen (ca. 1cm) entnommen. Anschließend wird das Ovar unter ständigem Schütteln für ca. 140min in 25ml Kollagenase (Typ I, C-0130, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen, Deutschland; 355U/ml, angesetzt in Barth's Lösung ohne Calcium in mM: NaCl 88, KCl 1, MgSO₄ 0,82, NaHCO₃ 2,4, Tris/HCl 5, pH 7,4) behandelt. Die Oocyten werden dann mit Barth's Lösung ohne Calcium gewaschen. Nur Oocyten im Reifestadium V (Dumont, 1972) werden für die weitere Behandlung ausgewählt und in Mikrotiterplatten (Nunc MicroWell™ Platten, Kat. Nr. 245128 + 263339 (Deckel), Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland), gefüllt mit Barth's-Lösung (in mM: NaCl 88, KCl 1, MgSO₄ 0,82, Ca(NO₃)₂ 0,33, CaCl₂ 0,41, NaHCO₃ 2,4, Tris/HCl 5, pH7.4) sowie Gentamicin (Gentamicin Sulfate, G-3632, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen, Deutschland; 100U/ml), überführt. Die Oocyten werden dann bei 19.2°C in einem Kühl-Brutschrank (Typ KB 53, WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aufbewahrt.

2. Injektion der Oocyten

Injektionselektroden, mit einem Durchmesser von 10 – 15 µm, werden mit einem Pipetten-Puller (Typ L/M-3P-A, List-electronic, Darmstadt-Eberstadt, Deutschland) hergestellt. Vor der Injektion werden Aliquots mit der Rezeptor-DNA bzw. GIRK1/4-DNA aufgetaut und mit Wasser auf eine Endkonzentration von 10ng/µl verdünnt. Die DNA-Proben werden mit 3200g für 120s zentrifugiert (Typ Biofuge 13, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Anschließend wird ein ausgezogener PE-Schlauch als Transferschlauch benutzt, um die Pipetten von hinten zu befüllen. Die Injektionselektroden werden an einer X,Y,Z-Verfahreinheit (Bearbeitungszentrum EP1090, isel-automation, Eiterfeld, Deutschland) befestigt. Mit Hilfe eines Macintosh Computers wird die Oocyten in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten angefahren und durch kurze Druckapplikation (0,5-3 bar, 3-6s) ca. 50nl der DNA-Lösung in die Oocyte injiziert.

3. Elektrophysiologische Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen wird eine Zwei-Elektroden-Spannungsklemme mit einem TURBO TEC-10CD (npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) Verstärker durchgeführt. Die hierfür notwendigen Mikropipetten werden aus Aluminiumsilikatglas (Kapillarrohr, Art.-Nr. 14 630 29, l=100mm, $\varnothing_a=1,60\text{mm}$, $\varnothing_i=1,22\text{mm}$, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) in zwei Zügen gezogen (Hamill et al., 1981). Strom- und Spannungselektroden haben einen Durchmesser von 1 - 3 μm und werden mit 1,5M KCl und 1.5M Kaliumacetat gefüllt. Die Pipetten haben einen kapazitiven Widerstand von 0,2 – 0,5 MW. Für die elektrophysiologischen Messungen werden die Oocyten in eine kleine Kammer überführt, die kontinuierlich mit normaler Rimland-Lösung (in mM: KCl 90, MgCl_2 3, HEPES 5, pH 7,2) gespült wird. Für eine Substanzapplikation wird die Perfusionslösung durch eine Substanzlösung mit gleicher Zusammensetzung und zusätzlich der gewünschten Substanzkonzentration ausgetauscht. Bei einem Klemmpotential von -60mV wird die erfolgreiche Expression der Rezeptor-DNA nach einer Woche überprüft. Nicht reagierende Oocyten werden verworfen. Alle weiteren werden für die Substanztestung verwendet. Die Daten werden mittels eines YT-Schreibers (YT-Schreiber, Model BD 111, Kipp & Zonen Delft BV, AM Delft, Niederlande) dokumentiert. Die einzelnen Werte werden in Origin (Auswertesoftware Microcal Origin, Microcal Software, Inc., Northampton, MA 01060-4410 USA (Additive GmbH, Friedrichsdorf/Ts, Deutschland) eingegeben. Mittelwerte, Standardabweichung, IC_{50} -Werte und IC_{50} -Kurven werden mit Origin berechnet. Diese Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Literatur:

Birgul, N. et al. (1999). Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO Journal* 18: 5892-5900

Blackburn, M. B. et al. (1995). The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.* 41 (8): 723-730

Brown, B.E. und Starrall, A.N. (1975). Isolation of proctolin, a myotropic peptide from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 21: 1879-1881

Coast, G.M. (1998). Insect Diuretic Peptides: Structures, Evolution and Actions. *American Zoology* 38: 442-449

Conklin et al. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* 363:274-276

Cox, K.J. et al. (1997). Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *J. Neurosci.* 17:1197-1205

Devereux et al. (1984). *Nucleic Acids Research* 12: 387

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180

Eriksen, K.K. (2000). Molecular cloning, genomic organization, developmental regulation, and a knock-out mutant of a novel leu-rich repeats-containing G-protein-

coupled receptor (DLGR-2) from *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 10:924-938

French-Constant, R.H. et al. (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance on *Drosophila* and invertebrate GABA_A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7209-7213

Gäde, G. et al. (1997a). Hormonal regulation in Insects: Facts, Gaps, and Future Directions. *Physiological Reviews* 77: 963-1032

Gäde, G. (1997b). The explosion of structural information on insect neuropeptides, In: *Progress in the chemistry of organic natural products* (Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, C. eds): 1-128

Ha, S.-D. et al (2000). Cloning and sequence analysis of cDNA for Diuretic Hormone Receptor from the *Bombyx mori*. *Mol. Cells* 10: 13-17

Hamill, O.P. et al. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfugers Arch.* 391: 85-100

Hauser, F. et al. (1998). Molecular cloning, genomic organization and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors from vertebrates. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 249: 822-828

Hay et al. (1997). P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (10): 5195-5200

Hewes, R. und Taghert, P. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research* 11 (6): 1126-1142

Holman, G.M. et al. (1986). Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae*: Members of a new family of Cephalomaotrophins. *Comparative Biochemical Physiology* 84C: 205

Holmes, S.P. et al. (2000). Cloning and transcriptional expression of a leucokinin-like peptide receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Insect Molecular Biol.* 9 (5): 457-465

Holman, G.M. (1991). Insect myotropic peptides: isolation, structural characterization and biological properties. In: *Insect Neuropeptides: Chemistry, Biology and Action* (Menn, J.J., Kelly, T.J., Masler, E.P., eds): 40-50

King, F.D. und Wilson, S. (1999). Recent advances in 7-transmembrane receptor research. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2: 83-95

Lagueux, M. et al. (1990). cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* encoding a novel member of the superfamily of insulins. *European Journal of Biochemistry* 187: 249-254

Lenz et al. (2000a). Molecular cloning and genomic organization of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to mammalian Galanin Receptors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 269: 91-96

Lenz et al. (2000b). Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 273: 571-577

Li, X.J. et al. (1991). Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *EMBO J.* 10: 3221-3229

Monnier, D. et al. (1992). NKD, a developmentally regulated tachykinin receptor in *Drosophila*. *J.Biol.Chem.* 267: 1298-1302

Osborne, R.H. (1996). Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and their Receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 69: 117-142

Pietrantonio, P.V. et al. (2000). Characterization of a leucokinin binding protein in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Malpighina tubule. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1147-1159

Plasterk (1996). The Tc1/mariner transposon family, *Transposable Elements/Current Topics in Microbiology and Immunology* 204: 125-143

Ramsey, J.A. (1954). Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus*. *Journal of Experimental Biology* 31: 104-113

Reagan, J.D. (1994). Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9-12

Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press

Seinsche, A. et al. (2000). Effect of helicokinins and ACE inhibitors on water balance and development of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Insect Physiology* 46: 1423-1431

Stables et al. (1997). A Bioluminescent Assay for Agonist Activity at Potentially Any G-protein coupled Receptor. *Analytical Biochemistry* 252: 115-126

Stratowa C. et al. (1995). Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein-linked receptors. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 574-581

Terhzaz, S. et al. (1999). Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 202: 3667-3676

Tobe, S.S. et al. (1994). Allatostatins, peptide inhibitors of juvenile hormone production in insects. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology* (Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S., eds): 12-19

Torfs, P. et al. (1999). The kinin peptide family in invertebrates. *Ann. NY Acad. Sci.* 897: 367-373

Vanden Broeck, J. et al. (1997). Insect Neuropeptides and Their Receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 8: 321-326

Vanden Broeck, J. (2001). Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 1-12

White J.H. et al. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396: 679-82

Patentansprüche

1. Polypeptid, welches die biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausübt und eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine zumindest 70%ige Identität mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist.
2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 entspricht.
3. Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.
5. Polynukleotid gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.
6. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsequenz einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 entspricht.
7. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es unter stringenten Bedingungen an die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 hybridisiert.
8. DNA-Konstrukt umfassend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 und einen heterologen Promotor.
9. Vektor umfassend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8.

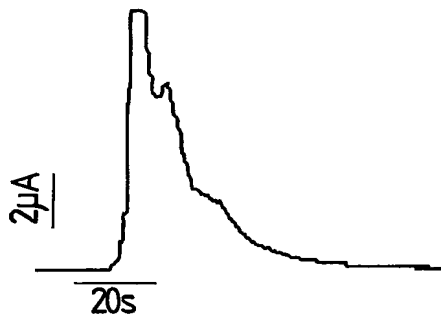
10. Vektor gemäß nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression des Polynukleotids in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
11. Wirtszelle enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8 oder einen Vektor gemäß Anspruch 9 oder 10.
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle, insbesondere um *E. coli*, handelt.
13. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine eukaryotische Zelle, insbesondere um eine Säuger- oder Insektenzelle, handelt.
14. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet.
15. Transgener Invertebrat enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7.
16. Transgener Invertebrat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* handelt.
17. Transgene Nachkommen eines Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16.
18. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 1, umfassend
 - (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 unter Bedingungen, die die Expression des Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 gewährleisten, oder

- (b) das Exprimieren eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 in einem in vitro-System, und
 - (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem in vitro-System.
19. Verfahren zum Herstellen eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, umfassend die folgenden Schritte:
- (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise, oder
 - (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer genomischen oder cDNA-Bank, die ausgehend von genomischer DNA bzw. mRNA aus Insektenzellen hergestellt wurde, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen, oder
 - (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
20. Verfahren zum Herstellen eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16, umfassend das Einbringen eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 oder eines Vektors gemäß Anspruch 9 oder 10.
21. Verfahren zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, insbesondere von Verbindungen, welche die Eigenschaften von Polypeptiden gemäß Anspruch 1 verändern, umfassend die folgenden Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13,

- (b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer chemischen Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von chemischen Verbindungen umfasst, und
 - (c) Detektieren veränderter Eigenschaften.
- 22. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Inkontaktbringen eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 oder einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und
 - (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
- 23. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die die Expression eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 verändert, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,
 - (b) Bestimmen der Konzentration des Polypeptids gemäß Anspruch 1, und

- (c) Bestimmen der chemischen Verbindung, die die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.
24. Verwendung eines Polypeptids gemäß Anspruch 1, eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, eines Vektors gemäß Anspruch 9 oder 10, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, eines Antikörpers gemäß Anspruch 14 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder zum Auffinden von Genen, die für Polypeptide codieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Helicokinin-Rezeptoren in Insekten beteiligt sind.
25. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 als Insektizid.

- 1 / 1 -

Fig. 1

A) Hv-Kinin Rez. exprimierende Oocyte

B) nicht exprimierende Oocyte

Expression von Helicokinin-Rezeptoren in Xenopus-Oozyten. Signal nach Zugabe von Peptid (Helicokinin III, 100nM für 20 Sekunden) bei A) Oozyten nach Injektion von Helicokinin-Rezeptor DNA, und bei B) Kontroll-Oozyten ohne Helicokinin-Rezeptor DNA

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer CropScience Aktiengesellschaft

<120> Helicokinin-Rezeptor

<130> Le A 36 033

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Heliothis virescens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1452)

<223>

<400> 1

atg gac act agt aca aca aat tca tca caa gat gac gac gcg gac tgg	48
Met Asp Thr Ser Thr Thr Asn Ser Ser Gln Asp Asp Asp Ala Asp Trp	
1 5 10 15	
cca agg aac agt tcc att gac gag tat att ata cac aat gga act aat	96
Pro Arg Asn Ser Ser Ile Asp Glu Tyr Ile Ile His Asn Gly Thr Asn	
20 25 30	
gat aca ttc gaa aca ttg tac gat gtg ccg act ggt atg ata gta ctc	144
Asp Thr Phe Glu Thr Leu Tyr Asp Val Pro Thr Gly Met Ile Val Leu	
35 40 45	
ttg tcg ttc ctg tac ggc tca ata tca gtt ctt gcg gtg gtg ggg aac	192
Leu Ser Phe Leu Tyr Gly Ser Ile Ser Val Leu Ala Val Val Gly Asn	
50 55 60	
ttt ctg gtg atg tgg gtc gtg gcc acc tcg aga aga atg cag agc gtc	240
Phe Leu Val Met Trp Val Val Ala Thr Ser Arg Arg Met Gln Ser Val	
65 70 75 80	
aca aac tgc tac ata gcc aac tta gct tta gct gac ata gtc ata gga	288
Thr Asn Cys Tyr Ile Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ile Val Ile Gly	
85 90 95	
tta ttc gct gta cca ttt caa ttt caa gcc gcg ctg cta cag cgg tgg	336
Leu Phe Ala Val Pro Phe Gln Phe Gln Ala Ala Leu Leu Gln Arg Trp	
100 105 110	
ctg cta ccg cac ttc atg tgt ccg ttc tgc ccg ttc gtg cag gcg ctc	384
Leu Leu Pro His Phe Met Cys Pro Phe Cys Pro Phe Val Gln Ala Leu	
115 120 125	
agt gtc aac gtc agc gtg ttt aca ctg aca gcc atc gca gtt gac aga	432
Ser Val Asn Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Ala Ile Ala Val Asp Arg	
130 135 140	
cat cgg gcg ata atc aca ccg ctc agc gcc cac act tca aag cgt att	480
His Arg Ala Ile Ile Thr Pro Leu Ser Ala His Thr Ser Lys Arg Ile	
145 150 155 160	
gcc aaa gta ata ata gtg gtt ata tgg ttt ctg gcg ctt tct tta gct	528

Ala Lys Val Ile Ile Val Val Ile Trp Phe Leu Ala Leu Ser Leu Ala	
165 170 175	
gct ccg atg gct atg tct tgg gag gtt atc atg gaa gat gaa tta gat	576
Ala Pro Met Ala Met Ser Trp Glu Val Ile Met Glu Asp Glu Leu Asp	
180 185 190	
cca gtt gca aaa atc ttc tac aaa aag ccg ttt tgt gca ccc acc gag	624
Pro Val Ala Lys Ile Phe Tyr Lys Lys Pro Phe Cys Ala Pro Thr Glu	
195 200 205	
ttc ggc tcg cat tca ctc gcc att tat aga ctg ttg ttg tat gta ttt	672
Phe Gly Ser His Ser Leu Ala Ile Tyr Arg Leu Leu Leu Tyr Val Phe	
210 215 220	
cag tat gta atc ccg ttg tgt gtg att acg ttt gcc tac gct cat atg	720
Gln Tyr Val Ile Pro Leu Cys Val Ile Thr Phe Ala Tyr Ala His Met	
225 230 235 240	
gcg atg aag ctg tgg gga gcg cgc gcc cca ggg aac gcg cag gag acg	768
Ala Met Lys Leu Gly Ala Arg Ala Pro Gly Asn Ala Gln Glu Thr	
245 250 255	
agg gac gct aac cac atg cga aac aag aag aag gtg ata aaa atg ttg	816
Arg Asp Ala Asn His Met Arg Asn Lys Lys Lys Val Ile Lys Met Leu	
260 265 270	
gtg ctg gtc gta gct ctg ttt gcg tta tgc tgg ctg ccg cta cag agc	864
Val Leu Val Val Ala Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu Gln Ser	
275 280 285	
tac tta tta cta caa tca ttt ttt cca tca att aac gag tac aag tac	912
Tyr Leu Leu Leu Gln Ser Phe Phe Pro Ser Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr	
290 295 300	
atc aac gtg ctt ttc ttt tgc ttc gac tgg cta gca atg agc aac tct	960
Ile Asn Val Leu Phe Phe Cys Phe Asp Trp Leu Ala Met Ser Asn Ser	
305 310 315 320	
tgc tat aac cca ttc atc tat gcc atc tac aac gaa aaa ttc aag aag	1008
Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Lys	
325 330 335	
gaa ttc aaa caa cga ttc act ttc ggg aaa aag cca agc aga ttc gtt	1056
Glu Phe Lys Gln Arg Phe Thr Phe Gly Lys Lys Pro Ser Arg Phe Val	
340 345 350	
aac gat agc tac gag gac ggc cag tca tac cga aca aga att tta tcg	1104
Asn Asp Ser Tyr Glu Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Ser	
355 360 365	
ttc cga tca acc aac gac aga agt ggc tat tca tcc aga aag tct ttg	1152
Phe Arg Ser Thr Asn Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Leu	
370 375 380	
aac ata ccg ccg ggg gac act tta aaa gtt cct tct aga aat tca tgt	1200
Asn Ile Pro Pro Gly Asp Thr Leu Lys Val Pro Ser Arg Asn Ser Cys	
385 390 395 400	
cat tgc atg gcg aat cag agc aga gaa aat gga ttt aac ttc atg aaa	1248
His Cys Met Ala Asn Gln Ser Arg Glu Asn Gly Phe Asn Phe Met Lys	
405 410 415	
act gaa gac atg gaa ggg cac gga aat agc agg cgg tat ctg aat ata	1296
Thr Glu Asp Met Glu Gly His Gly Asn Ser Arg Arg Tyr Leu Asn Ile	

Seite 3

Ala Lys Val Ile Ile Val Val Ile Trp Phe Leu Ala Leu Ser Leu Ala
 165 170 175
 Ala Pro Met Ala Met Ser Trp Glu Val Ile Met Glu Asp Glu Leu Asp
 180 185 190
 Pro Val Ala Lys Ile Phe Tyr Lys Lys Pro Phe Cys Ala Pro Thr Glu
 195 200 205
 Phe Gly Ser His Ser Leu Ala Ile Tyr Arg Leu Leu Leu Tyr Val Phe
 210 215 220
 Gln Tyr Val Ile Pro Leu Cys Val Ile Thr Phe Ala Tyr Ala His Met
 225 230 235 240
 Ala Met Lys Leu Trp Gly Ala Arg Ala Pro Gly Asn Ala Gln Glu Thr
 245 250 255
 Arg Asp Ala Asn His Met Arg Asn Lys Lys Lys Val Ile Lys Met Leu
 260 265 270
 Val Leu Val Val Ala Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu Gln Ser
 275 280 285
 Tyr Leu Leu Leu Gln Ser Phe Phe Pro Ser Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 Ile Asn Val Leu Phe Phe Cys Phe Asp Trp Leu Ala Met Ser Asn Ser
 305 310 315 320
 Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Lys
 325 330 335
 Glu Phe Lys Gln Arg Phe Thr Phe Gly Lys Lys Pro Ser Arg Phe Val
 340 345 350
 Asn Asp Ser Tyr Glu Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Ser
 355 360 365
 Phe Arg Ser Thr Asn Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Leu
 370 375 380
 Asn Ile Pro Pro Gly Asp Thr Leu Lys Val Pro Ser Arg Asn Ser Cys
 385 390 395 400
 His Cys Met Ala Asn Gln Ser Arg Glu Asn Gly Phe Asn Phe Met Lys
 405 410 415

Thr Glu Asp Met Glu Gly His Gly Asn Ser Arg Arg Tyr Leu Asn Ile
420 425 430

Arg Met Ser Asn Pro Asp Ile Gly Lys Arg Arg Leu Ala Lys Lys Leu
435 440 445

Ser Asn Arg Asp Asp Met Pro Ile Gly Asp Glu Arg Val Ser Glu Leu
450 455 460

Tyr Ile Phe Pro Asn Ser Asn Ile Val Glu Phe Thr Asp Ile Ser Tyr
465 470 475 480

Asp Asp Lys Val

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEINSCHÉ A ET AL: "Effect of helicokinins and ACE inhibitors on water balance and development of <i>Heliothis virescens</i> larvae." JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, vol. 46, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 1423-1431, XP002255031 ISSN: 0022-1910	11,13,22
Y	the whole document	1-10,12, 14-21, 23,24
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2003

Date of mailing of the international search report

09/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Morawetz, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/03519

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLMES S P ET AL: "Cloning and transcriptional expression of a leucokinin-like peptide receptor from the Southern cattle tick, Boophilus microplus (Acari: Ixodidae)." INSECT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 9, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 457-465, XP002255032 ISSN: 0962-1075 the whole document	1-24
Y	COX KINGSLEY J A ET AL: "Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from Lymnaea stagnalis and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 17, no. 4, 15 February 1997 (1997-02-15), pages 1197-1205, XP002167959 ISSN: 0270-6474 the whole document	1-24
Y	DE 100 13 618 A (BAYER AG) 20 September 2001 (2001-09-20) page 2, line 3 -page 10, line 41 und SEQ ID NO: 2	1-24
Y	WO 01 70980 A (PE CORP NY) 27 September 2001 (2001-09-27) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 page 5, line 18 -page 40, line 30; table 1	1-24
A	BLACKBURN MICHAEL B ET AL: "The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult Helicoverpa zea." JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, vol. 41, no. 8, 1995, pages 723-730, XP002255033 ISSN: 0022-1910 the whole document	
A	PIETRANTONIO PATRICIA V ET AL: "Characterization of a leucokinin binding protein in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Malpighian tubule." INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 30, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1147-1159, XP002255034 ISSN: 0965-1748 cited in the application the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03519

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>OEH U ET AL: "Myotropic effect of helicokinins, tachykinin-related peptides and Manduca sexta allatotropin on the gut of Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae)."</p> <p>JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, vol. 49, no. 4, 20 April 2003 (2003-04-20), pages 323-337, XP002255035</p> <p>ISSN: 0022-1910</p> <p>the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/03519

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 25
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/03519

BOX I.2

Claim No.: 25

The current Claim 25 relates to a product characterized by a desirable characteristic or property, namely that of being a modulator of a polypeptide as per Claim 1. The claim encompasses all the uses of this product as an insecticide, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for none of these products. In the present case, the claim lacks the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Moreover, the claim also lacks the requisite clarity (PCT Article 6) since it attempts to define the product and hence the method in terms of the result to be achieved. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03519

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10013618	A	20-09-2001	DE 10013618 A1	20-09-2001
			EP 1136501 A2	26-09-2001
			JP 2001299369 A	30-10-2001
			US 2002056151 A1	09-05-2002
WO 0170980	A	27-09-2001	AU 5094701 A	03-10-2001
			WO 0170980 A2	27-09-2001
			US 2003092124 A1	15-05-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03519

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/566

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SEINSCH A ET AL: "Effect of helicokinins and ACE inhibitors on water balance and development of Heliothis virescens larvae." JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, Bd. 46, Nr. 11, November 2000 (2000-11), Seiten 1423-1431, XP002255031 ISSN: 0022-1910	11,13,22
Y	das ganze Dokument	1-10,12, 14-21, 23,24



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. September 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/10/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Morawetz, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03519

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HOLMES S P ET AL: "Cloning and transcriptional expression of a leucokinin-like peptide receptor from the Southern cattle tick, Boophilus microplus (Acari: Ixodidae)." INSECT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 9, Nr. 5, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 457-465, XP002255032 ISSN: 0962-1075 das ganze Dokument	1-24
Y	COX KINGSLEY J A ET AL: "Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from Lymnaea stagnalis and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, Bd. 17, Nr. 4, 15. Februar 1997 (1997-02-15), Seiten 1197-1205, XP002167959 ISSN: 0270-6474 das ganze Dokument	1-24
Y	DE 100 13 618 A (BAYER AG) 20. September 2001 (2001-09-20) Seite 2, Zeile 3 -Seite 10, Zeile 41 und SEQ ID NO: 2	1-24
Y	WO 01 70980 A (PE CORP NY) 27. September 2001 (2001-09-27) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 Seite 5, Zeile 18 -Seite 40, Zeile 30; Tabelle 1	1-24
A	BLACKBURN MICHAEL B ET AL: "The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult Helicoverpa zea." JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, Bd. 41, Nr. 8, 1995, Seiten 723-730, XP002255033 ISSN: 0022-1910 das ganze Dokument	
A	PIETRANTONIO PATRICIA V ET AL: "Characterization of a leucokinin binding protein in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Malpighian tubule." INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 30, Nr. 12, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 1147-1159, XP002255034 ISSN: 0965-1748 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03519

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>OEH U ET AL: "Myotropic effect of helicokinins, tachykinin-related peptides and Manduca sexta allatotropin on the gut of Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae)."</p> <p>JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY, Bd. 49, Nr. 4, 20. April 2003 (2003-04-20), Seiten 323-337, XP002255035 ISSN: 0022-1910 das ganze Dokument -----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03519

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 25
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche. Nr.: 25

Der geltende Patentanspruch 25 bezieht sich auf ein Produkt charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Modulator eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 zu sein. Der Patentanspruch umfasst alle Verwendungen dieses Produkts als Insektizid, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keins dieser Produkte liefert. Im vorliegenden Fall fehlt dem Patentanspruch die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt dem Patentanspruch auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihm versucht wird, das Produkt und damit das Verfahren über das erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03519

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10013618 A	20-09-2001	DE 10013618 A1	20-09-2001
		EP 1136501 A2	26-09-2001
		JP 2001299369 A	30-10-2001
		US 2002056151 A1	09-05-2002
WO 0170980 A	27-09-2001	AU 5094701 A	03-10-2001
		WO 0170980 A2	27-09-2001
		US 2003092124 A1	15-05-2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.